

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平6-504678

第1部門第1区分

(43)公表日 平成6年(1994)6月2日

(51)Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I
C 1 2 N 9/64		Z 9161-4B	
A 6 1 K 37/465	A C B	8314-4C	
C 1 2 N 5/10			
		8931-4B	C 1 2 N 15/ 00 A
		9281-4B	5/ 00 B
	審査請求	未請求	予備審査請求 有 (全 11 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平4-507422	(71)出願人	ザイモジェネティクス、インコーポレイテ イド
(86) (22)出願日	平成4年(1992)2月28日		アメリカ合衆国、ワシントン 98105、シ アトル、ノースイースト、ルーズベルト
(85)翻訳文提出日	平成5年(1993)8月27日		ウェイ 4225
(86)国際出願番号	P C T / U S 9 2 / 0 1 6 3 6	(71)出願人	ノボ ノルディスク アクティーゼルスカ ブ
(87)国際公開番号	W O 9 2 / 1 5 6 8 6		デンマーク国、デーコー-2880 バグスバ エルト、ノボ アレ (番地なし)
(87)国際公開日	平成4年(1992)9月17日	(74)代理人	弁理士 宇井 正一 (外4名)
(31)優先権主張番号	6 6 2 , 9 2 0		
(32)優先日	1991年2月28日		
(33)優先権主張国	米国 (U S)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 修飾されたファクターV II

(57)【要約】

血液凝固カスケードを効果的に中断する化合物を製造するためにファクターV IIの触媒活性部位が修飾される。この修飾は、ファクターV IIが血漿ファクターX又はI Xを活性化することを実質的に不可能にする。修飾されたファクターV IIの医薬組成物は種々の凝固関連疾患の治療のために使用される。

請 求 の 範 囲

1. 患者において血液凝固を阻害する方法であって、血漿ファクターX又はIXを活性化する修飾されたファクターVIIの能力を実質的に阻害する修飾を、その触媒中心に少なくとも1つ有するファクターVIIを含んで成る組成物の療法的有効量を患者に投与する、ことを含んで成る方法。

2. 前記修飾がファクターVIIとセリンプロテアーゼ阻害剤との反応を含んで成る、請求項1に記載の方法。

3. 前記阻害剤が有機リン化合物、スルファニルフルオリド、ペプチドハロメチルケトン又はアザペプチドである、請求項2に記載の方法。

4. 前記阻害剤が、D-Phe-Pro-Arg クロロメチルケトン又はダンシル-Glu-Gly-Arg クロロメチルケトンから選択されたペプチドハロメチルケトンである、請求項2に記載の方法。

5. 前記ファクターVIIの修飾が、Ser、Asp及びHisの触媒トライアド中の少なくとも1つのアミノ酸の置換、挿入又は除去を含んで成る、請求項1に記載の方法。

6. 血漿因子X又はIXを活性化する修飾されたファクターVIIの能力を実質的に阻害する修飾を少なくとも1個活性中心内に有するファクターVIIを、医薬として許容されるキャリアーと共に含んで成る医薬組成物。

7. 前記修飾が、ファクターVIIとセリンプロテアーゼ阻害剤との反応を含んで成る、請求項6に記載の医薬組成物。

8. 前記阻害剤が有機リン化合物、スルファニルフルオリド、ペプチドハロメチルケトン又はアザペプチドである、請求項6に記載の医薬組成物。

21. ヒト由来である、請求項13に記載の修飾されたファクターVII。

22. ウシ由来である、請求項13に記載の修飾されたファクターVII。

23. 実質的に純粋である、請求項13に記載の修飾されたファクターVII。

24. その活性化部位において開裂される、請求項13に記載の修飾されたファクターVII。

25. 組織因子に結合する、請求項13に記載の修飾されたファクターVII。

26. 組織因子への結合について野性型ファクターXIIaと競争する、請求項13に記載の修飾されたファクターVIIa。

27. 2つの作用可能に連結された配列コード領域を含んで成るポリヌクレオチド分子であって、それぞれ、ブレーブペプチドとビタミンK-依存性蛋白質のglaドメイン、並びにSer、Asp及びHisの触媒トライアド中に少なくとも1つのアミノ酸修飾を有するglaドメイン不含有ファクターVIIをコードしており、ここで発現の際は前記ポリヌクレオチドは、血漿ファクターX又はIXを活性化する能力が実質的に低下している修飾されたファクターVII分子をコードする、ことを特徴とするポリヌクレオチド分子。

28. 前記アミノ酸修飾を有する触媒トライアドがSer₂₂₂、Asp₂₂₂及びHis₂₂₂から構成されている、請求項27に記載のポリヌクレオチド分子。

29. 請求項27のポリヌクレオチド分子によりトランスフェクトされた哺乳類セルライン。

30. 前記触媒的トライアドがヒトファクターVIIのSer₂₂₂、Asp₂₂₂及びHis₂₂₂である、請求項28に記載の方法。

7. 前記阻害剤が、D-Phe-Pro-Arg クロロメチルケトン又はD-ダンシル-Glu-Gly-Arg クロロメチルケトンから選択されたペプチドハロメチルケトンである、請求項6に記載の医薬組成物。

10. 前記ファクターVIIの修飾が、Ser、Asp及びHisの触媒トライアド中の少なくとも1個のアミノ酸の置換、挿入又は除去を含んで成る、請求項6に記載の医薬組成物。

11. ファクターVIIが残基Ser₂₂₂の置換によって修飾されている、請求項10に記載の医薬組成物。

12. 前記修飾されたファクターVIIがヒト由来である、請求項6に記載の医薬組成物。

13. 血漿ファクターX又はIXを活性化するファクターVIIaの能力を実質的に阻害する、Ser、Asp及びHisの触媒トライアド中の少なくとも1つのアミノ酸修飾を含んで成る、ファクターVII。

14. 前記触媒トライアドがSer₂₂₂、Asp₂₂₂及びHis₂₂₂から構成される、請求項13に記載の修飾されたファクターVII。

15. 前記アミノ酸修飾が置換である、請求項14に記載の修飾されたファクターVII。

16. 前記置換がSer₂₂₂においてである、請求項15に記載の修飾されたファクターVII。

17. Ser₂₂₂がAla、Gly、Met又はThrにより置換されている請求項16に記載の修飾されたファクターVII。

18. Ser₂₂₂がAlaにより置換されている、請求項17に記載の修飾されたファクターVII。

19. Asp₂₂₂がGluにより置換されている、請求項15に記載の修飾されたファクターVII。

20. His₂₂₂がLys又はArgにより置換されている、請求項15に記載の修飾されたファクターVII。

明 細 書

修飾されたファクターVII

発明の分野

本発明は抗凝固剤として有用な蛋白質に関する。さらに詳しくは、本発明は血液凝固を阻害するファクターVIIの修飾形に関する。

発明の背景

血液凝固は、最終的にフィブリンクロットを生じさせる種々の血液成分又は因子の複雑な相互作用から成る過程である。一般に、凝固「カスケード」と称されていることに関与する血液成分は、活性化物質の作用によりそれ自体活性化された凝固因子である蛋白質分解酵素に転換される酵素的に不活性な蛋白質、すなわちプロ酵素又はザイモゲン (zymogen) である。この様な転換を受けた凝固因子は一般に「活性因子」と称され、そして小文字の「a」の添字により示される (例えば、ファクターVIIa)。

活性化されたファクターX (「Xa」) はプロトロンビンのトロンビンへの転換のために必要であり、このトロンビンは次に、フィブリンクロットの形成の最終段階としてフィブリノーゲンをフィブリンに転換する。ファクターXの活性化を促進する2つの系又は経路が存在する。「内経路」 (intrinsic pathway) は、血漿中にのみ存在する因子の利用によりトロンビン形成を導く反応を意味する。一連のプロテアーゼ-介在活性化が最終的にファクターIXaを生じさせ、これがファクターVIIaと組合わせにおいてファクターXをXaに開裂させる。血液凝固の「外経路」 (extrinsic pathway) において、ファクターVIIaとそのコファクター、すなわち組織

因子、により同じ蛋白質分解が行われる。組織因子は膜結合蛋白質であり、そして通常は血漿中で循環しない。しかしながら、血管の破壊の際、このものは Ca^{++} 及びリン脂質の存在下でファクターV II aと複合体を形成することによりファクターXの活性化又はファクターIXの活性化を触媒する(Nemerson及びQantray, *Biochem.* 25: 4020-4033(1986))。止血におけるこれら2つの凝固経路の相対的重要性は明らかでないが、近年、ファクターV II及び組織因子が血液凝固の制御において要の役割を演ずることが見出された。

ファクターV IIは単一鎖サイモゲンとして血液中を循環する痕跡の血漿糖蛋白質である。サイモゲンは触媒的に不活性である

(Williamsら、*J. Biol. Chem.* 264: 7536-7543(1989); Raoら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 6687-6691(1988))。単鎖ファクターV IIは、ファクターX a、ファクターX II a、ファクターIX a又はトロンビンによりイソペプチドで2本鎖ファクターV II aに転換され得る。ファクターX aはファクターV IIの主たる生理的活性化物質であると考えられる。止血に関与する他のいくつかの血漿蛋白質と同様に、ファクターV IIはその活性のためにビタミンKに依存し、それは、蛋白質のアミノ末端に群がっている多数のグルタミン酸残基のγ-カルボキシル化のために必要である。これらのγ-カルボキシル化グルタミン酸は、リン脂質と共に、ファクターV IIの金属介在相互作用のために必要とされる。

サイモゲンであるファクターV IIの活性化2本鎖分子への転換は、分子の中央近くに位置する内部ペプチド結合の開裂により起こる。ヒトファクターV IIにおいて、活性化開裂部位はArg₁₅₁-Ile₁₅₂である(Hagenら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 2412-2416(1986); Thimら、*Biochem.* 27: 7785-7793(1988)、この両者を引用により本明細書に組み入れる)。ウシ因子V IIは類似のArg₁₅₁-Ile₁₅₂結合

における開裂により活性化される(Takeyaら、*J. Biol. Chem.* 263: 14888-14877, 1988)。組織因子、リン脂質及びカルシウムイオンの存在下で、2本鎖ファクターV II aは限定的蛋白質分解によりファクターX又はファクターIXを急速に活性化する。

患者において凝固カスケードを選択的にブロックすることがしばしば必要である。抗凝固剤、例えばヘパリン、クマリン、クマリンの誘導体、インダンジオン誘導体、又は他の薬剤を、例えば腎臓透析の間に、深部静脈血栓、散在性血管内凝固(DIC)、及び他の疾患の持ち主の治療のために使用することができる。例えば、ヘパリン処理、又はクエン酸イオンによる体外処理(米国特許No. 4,500,309)を透析において用いて処理の間の凝固を防止することができる。ヘパリンはまた、外科手術を受ける患者における深部静脈血栓の予防においても使用される。

しかしながら、ヘパリン及び他の抗凝固剤は不所望の副作用を有することがある。入手可能な抗凝固剤は一般に、凝固部位で特異的に作用するのではなく、むしろ全体で作用する。例えば、ヘパリンは重症の出血を惹起するであろう。さらに、約80分間の半減期をもって、ヘパリンは血液から急速に除去され、頻繁に投与しなければならない。ヘパリンはアンチトロンビンIII(ATIII)のコファクターとして作用し、そしてATIIIはDICの治療において急速に消費されるので、適切なヘパリン供給量を維持することがしばしば困難であり、ATIII及びヘパリンのレベルの連続的なモニターが必要である。ヘパリンはまた、ATIIIの消費が激しい場所には効果がない。さらに、ヘパリンの長期の使用は血小板の凝集を増加させ、そして血小板の数を減少させ、そして骨粗鬆症の進行に関与する。インダンジオン誘導体も毒性副作用を有する。

上に簡単に記載した抗凝固剤に加えて、幾つかの天然蛋白質が抗

凝固活性を有することが知られている。例えば、Reuteliugspenger(米国特許No. 4,738,018)はウシ大動脈及びヒトのヘソ静脈動脈から抗凝固蛋白質を単離した。Wakiら(米国特許No. 4,732,891)はヒト胎盤由来の抗凝固蛋白質を開示している。さらに、ATIIIは療法的抗凝固剤として提案されている(Schipperら、*Lancet* 1(8069): 854-856(1978); Jordan、米国特許No. 4,386,025; Bockら、米国特許No. 4,517,294)。

比較的低投与量で投与することができ、そして伝統的な抗凝固組成物が有する不所望の副作用を生じさせない抗凝固活性を有する改良された組成の必要性がなお当業界に存在する。本発明は、損傷部位において特異的に作用し、そしてさらに他の関連の利点を提供する抗凝固剤を提供することによりこの要求を満たすものである。

発明の要約

抗凝固性を有する修飾されたファクターV IIを含んで成る新規な組成物が提供される。ファクターV II配列は少なくとも1個のアミノ酸修飾を有し、この修飾は、血漿ファクターX又はIXの活性化を触媒する活性化されたファクターV IIの能力を低下させ、そしてそれにより凝固活性を阻害することができるように選択される。新規ファクターV IIは少なくとも1個のアミノ酸置換によって修飾された活性部位を有し、そしてその修飾された形態において組織因子と結合することができる。

本発明の組成物は、医薬組成物に製剤化された場合に患者を治療するための方法において特に有用であり、ここでこれらは、凝固-関連状態を治療するために、種々の疾患状態を有する個体に投与される。組織因子に結合することができるがしかし凝固カスケード中の他の因子の活性性を触媒する能力が実質的に低下している前記の

ときファクターV II分子は、より長い血漿半減期を有し、そしてそれ故に他の抗凝固剤と比較した場合に、抗凝固活性の対応して一層長い期間を有するであろう。本発明の組成物についての医学的標示は、抗凝固剤により一般に治療されるもの、例えば深部静脈血栓、肺塞栓、発作、散在性血管内凝固(DIC)及び心筋梗塞である。従って、患者において凝固を阻害する方法は、Ser₁₅₁、Asp₁₅₂及びHis₁₅₃の触媒トリアド(triad)中に少なくとも1つのアミノ置換を有するファクターV IIを、凝固を効果的に阻害するのに十分な量において投与することを含んで成る。

典型的には、ヒトへの投与のため、医薬組成物は、修飾されたヒトファクターV II蛋白質並びに医薬として許容されるキャリアー及び緩衝を含んで成るであろう。

ヒト及びウシファクターV IIの好ましい態様において、活性部位残基Ser₁₅₁が修飾され、Gly、Met、Thr又はさらに好ましくはAlaにより置換される。この様な置換は、別々に行うことができ、あるいはHis₁₅₃及びAsp₁₅₂を含む触媒的トリアド中の他の部位における置換との組合せにおいて行うことができる。

他の観点において、本発明は、それぞれビタミンK-依存性血漿蛋白質のプレプロペプチド及びglaドメイン、並びにglaドメイン不含有ファクターV II蛋白質をコードする2つの作用可能に連結された配列コード領域を含んで成るポリヌクレオチド配列に関し、ここで発現の際に前記ポリヌクレオチドは、血漿ファクターX又はIXを有意に活性化せずして組織因子に結合することができる修飾されたファクターV II分子をコードする。このポリヌクレオチドにより発現される修飾されたファクターV II分子は、生物学的に活性な抗凝固剤である。すなわちこれは、凝固カスケード、そしてそれ故にフィブリンの沈着又はクロットの形成を阻害することができる

る。この修飾されたファクターV IIを発現させるため、ポリヌクレオチド分子は、哺乳類細胞系、例えばBHK、BHK₂₁又は...細胞系にトランスフェクトされる。

図面の簡単な説明

図はSer₄₄→Ala 修飾ファクターV II DNA配列のための発現ベクターの作製を示す。使用される記号は、0-1、すなわちアデノウイルス5からの0-1マップユニット；E、すなわちSV40エンハンサー；MLP、すなわちアデノウイルス2主要後期プロモーター；SS、すなわち1組のスプライス部位；及びpA、すなわちSV40からの後期オリエンテーションのポリアデニレーションシグナルを含む。

特定の態様の記載

抗凝固活性を有する新規な修飾されたファクターV IIが本発明により提供される。この修飾されたファクターV IIはザイモゲン（すなわち、単量分子）の形態であってもよく、又はその活性化部位において開裂されていてもよい。修飾されたファクターV IIの組成物は、凝固カスケードを阻害するために種々の哺乳類、特にヒトに投与するために適当である。修飾されたファクターV IIは他の抗凝固化合物と組合わせて、又はそれに代えて投与することができる。

ファクターV IIは凝固カスケード、特に外経路（extrinsic pathway）を含むそれにおいて重要な役割を演ずる。循環する血漿中に不活性な単量ザイモゲン蛋白質として存在し、一旦活性化されれば、ファクターV II aは組織因子及びカルシウムイオンとの組合せにおいてファクターXをX aに活性化し、そしてI XをI X aに活性化し、最終的にフィブリンクロットを形成せしめる。

本発明は、ファクターV II aによるファクターX及びI Xの活性

化を回避又は阻害することにより、凝固カスケード中の前記の事象の列を阻害する能力を提供する。本発明のファクターV II蛋白質は、ファクターV II aの触媒活性を低下させるように修飾された触媒部位を有するが、この分子は組織因子に結合する能力を維持している。修飾されたファクターV II分子は、組織因子への結合について生来のファクターV II及び/又はV II aと競争する。その結果、ファクターX及びI Xの活性化が阻害される。

本発明の1つの観点において、ファクターV II aの触媒活性は触媒中心又はトライアドの化学的誘導体化により阻害される。誘導体化は、例えば、ファクターV IIを、不可逆的阻害剤、例えば有機リン化合物、スルホニルフルオリド、ペプチドハロメチルケトンもしくはアザペプチドと反応せしめることにより、又はアシル化により達成させる。好ましいペプチドハロメチルケトンにはPPACK（D-Phe-Pro-Arg クロロメチルケトン；米国特許No. 4,318,804、引用により本明細書に組入れる）、及びDEQRcK（ダンシル-Glu-Gly-Arg クロロメチルケトン）が含まれる。

他の観点において、ファクターV II aの触媒活性はまた、アミノ酸を置換、挿入又は除去することによっても阻害され得る。好ましい態様において、アミノ酸置換は、ファクターV II aの触媒部位に寄与するアミノ酸を含有する領域として本明細書において定義されるファクターV II触媒トライアドのアミノ酸配列中で行われる。触媒トライアド中の置換、挿入及び除去は一般に触媒部位を形成するアミノ酸において、又はその近傍において行われる。ヒト及びウシのファクターV II蛋白質において、触媒トライアドを形成するアミノ酸はSer₄₄、Asp₄₂及びHis₅₃である（添字は配列中の位置を示す）。他の哺乳類種からのファクターV II中の触媒部位は、特に蛋白質の単離及びアミノ酸配列分析を含めて現在利用可能な技法を用

いて決定することができる。触媒部位はまた、ある配列を他のセリンプロテアーゼ、特にその活性部位がすでに知られている（Siglerら、*J. Mol. Biol.*, 35:143-164(1968)、引用により本明細書に組み入れる）キモトリプシンと平列させ、そして該平列から類似の活性部位残基を決定することによっても決定することができる。

アミノ酸の置換、挿入又は除去は、ファクターV II aによるファクターX及び/又はI Xの活性化を回避又は阻害するように行われる。しかしながら、この様に修飾されたV IIはまた、凝固カスケード中の組織因子への結合について真正なファクターV II及び/又はファクターV II aと競争する能力を維持しているべきである。この様な競争は、例えば本明細書に記載の凝固測定（clotting assay）、又は細胞表面組織因子を有するセルライン、例えばヒト膀胱癌セルラインJ82(Sakaiら、*J. Biol. Chem.*, 264:9980-9988(1989)、引用により本明細書に組み入れる）を用いての競争結合測定により容易に決定することができる。

ファクターV II中の触媒部位を形成することができるアミノ酸、例えばヒト及びウシファクターV II中のSer₄₄、Asp₄₂及びHis₅₃は置換されていても又は除去されてもよい。本発明において、単一アミノ酸のみを変化させ、これによって、分子の抗原性を増加させ又は組織因子に結合するその能力を阻害する可能性を最小にすることができる。しかしながら2以上のアミノ酸変化（置換、付加、又は除去）を行うことができ、そして置換、付加及び除去（いずれも1又は複数）を行うこともできる。ヒト及びウシのファクターV II、Ser₄₄は好ましくはAla、Gly、Met、Thr 又は他のアミノ酸により置換されていてもよい。AspをGluにより、そしてHisをLys 又はArgにより置換するのが好ましい。一般に、置換は蛋白質の三次構造を可能な限り破壊しないように選択される。Dayhoffらのモデ

ル (*Atlas of Protein Structure 1978*, Nat'l Biomed. Res. Found., ワシントン D.C.) (引用により本明細書に組み入れる) を他のアミノ酸置換の選択におけるガイドとして使用することができる。ヒト、ウシ又は他の種の適当なファクターV II配列の触媒部位に前記のように変化を導入し、そして得られた蛋白質を、触媒活性の阻害及び生ずる抗凝固活性のレベルについて本明細書に記載するようにして試験することができる。修飾されたファクターV IIについて、触媒活性は実質的に、一般に対応する種の野生型ファクターV IIの触媒活性の約5%未満に、さらに好ましくは約1%未満に、阻害される。本発明の蛋白質は組換えDNA 技法を用いて製造することができる。一般に、クローニングされた野生型ファクターV II DNA配列が所望の蛋白質をコードするように修飾される。次に、この修飾された配列が発現ベクターに挿入され、今度はこれが宿主細胞に形質転換（transform又はtransfect）される。高等真核細胞、特に培養された哺乳類細胞が宿主細胞として好ましい。ヒトファクターV IIの完全なヌクレオチド配列及びアミノ酸配列が知られている。米国特許No. 4,784,950を参照のこと（引用により本明細書に組み入れる）。この特許明細書には、組換えヒトファクターV IIのクローニング及び発現が記載されている。ウシファクターV IIの配列はTakeyaら、*J. Biol. Chem.*, 263:14868-14872(1988)に記載されている（引用により本明細書に組み入れる）。

アミノ酸配列の変更は種々の技法により達成することができる。DNA 配列の修飾は部位特異的変異誘発により行うことができる。部位特異的変異誘発の技法は当業界においてよく知られており、そして例えばZoller及びSmith (*CDNA* 3:479-488, 1984)により記載されている。従ってファクターV IIのヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を用いて選択された変化を導入することができる。

本発明に従って修飾されたファクターV IIには、ビタミンK-依存性血漿蛋白質であるファクターIX、ファクターX、プロトロンビン、プロテインC、プロテインS又はプロテインZのいずれか1つのglaドメインにより置換されたアミノ末端部分(glaドメイン)を有する蛋白質が含まれる。ビタミンK-依存性血漿蛋白質のglaドメインは、γ-カルボキシグルタミン酸残基の存在により特徴付けられ、そして一般に約30〜約40アミノ酸の長さを有し、C-末端はそれぞれの遺伝子中のエクソン-イントロン境界の位置に対応する。異種性glaドメインを有するファクターV IIを製造する方法は米国特許No. 4,784,950に記載されており、引用により本明細書に組み入れる。

本発明において使用するためのDNA配列は、典型的にはファクターV II蛋白質のアミノ末端にプレプロペプチドをコードしており、適切な翻訳後プロセッシング(例えば、グルタミン酸残基のγ-カルボキシ化)及び宿主細胞からの分泌が得られる。このプレプロペプチドは、ファクターV IIのそれでもよく、あるいは他のビタミンK-依存性血漿蛋白質、例えばファクターIX、ファクターX、プロトロンビン、プロテインC又はプロテインSのそれであってもよい。当業者に予想されるように、修飾されたファクターV IIのアミノ酸配列に追加の修飾を行うことができ、この場合これらの修飾は蛋白質が抗凝固因子として作用する能力を有意に阻害しないものである。例えば、係属中の米国特許出願No. 07/471,313(引用により本明細書に組み入れる)に一般的に記載されているように、触媒トリアド中で修飾されたファクターV IIはまた、ザイモゲンであるファクターV IIのその活性化された2本鎖形への転換を防止するために活性化阻害部位において修飾することもできる。

本発明を実施するために使用するための発現ベクターは、クロ-

ン化遺伝子又はcDNAの転写を指令することができるプロモーターを含んで成るであろう。培養された哺乳類細胞において使用するための好ましいプロモーターには、ウイルス性プロモーター及び細胞性プロモーターが含まれる。ウイルス性プロモーターには、SV40プロモーター(Subramaniら、*Mol. Cell. Biol.* 1:854-864, 1981)及びCMVプロモーター(Boshartら、*Cell*, 41:521-530, 1985)が含まれる。特に好ましいウイルスプロモーターは、アデノウイルス2からの主要後期プロモーター(Kaufman及びSharp、*Mol. Cell. Biol.* 2:1304-1319, 1982)である。細胞性プロモーターには、マウス・カッパー遺伝子プロモーター(Bergmanら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:7041-7045, 1983)、及びマウスV_Hプロモーター(Lohら、*Cell* 33:85-93, 1983)が含まれる。特に好ましい細胞性プロモーターはマウス・メタロチオネイン-Iプロモーター(Palmiterら、*Science* 222:809-814, 1983)である。発現ベクターはまた、プロモーターから下流であって且つファクターV II配列自体のための挿入部位から上流に位置する一セットのRNAスライス部位を含有することができる。好ましいRNAスライス部位はアデノウイルス及び/又は免疫グロブリン遺伝子から得ることができる。また、発現ベクター中には前記挿入部位の下流に位置するポリアデニレーションシグナルが含まれる。特に好ましいポリアデニレーションシグナルには、SV40からの前期又は後期ポリアデニレーションシグナル(Kaufman及びSharp、前掲)、アデノウイルス5 E1b領域からのポリアデニレーションシグナル、ヒト成長ホルモン遺伝子ターミネーター(DeNofraら、*Nuc. Acids Res.* 9:3719-3730, 1981)、又はヒトファクターV II遺伝子もしくはウシファクターV II遺伝子からのポリアデニレーションシグナルが含まれる。発現ベクターはまた、非コードウイルスリーダー配列、例えばプロモーターとRNAスライス部位との間に位置するアデノ

ウイルス2トリパルタイトリダー、及びエンハンサー配列、例えばSV40エンハンサーを含むことができる。

クローン化されたDNA配列は例えばリン酸カルシウム介在トランスフェクション(Wiglerら、*Cell* 14:725-732, 1978; Corsaro及びPearson、*Somatic Cell Genetics* 7:603-616, 1981; Graham及びVan der Eb、*Virology* 52d:456-467, 1973)又はエレクトロポレーション(Neumannら、*EMBO J.* 1:841-845, 1982)により、培養された哺乳類細胞に導入される。外来性DNAを発現する細胞を同定しそして選択するため、選択可能な表現型を提供する遺伝子(選択マーカー)が一般に注目の遺伝子又はcDNAと共に細胞に導入される。好ましい選択マーカーには、薬物、例えばネオマイシン、ハイグロマイシン、及びメソトレキセートに対する耐性を付与する遺伝子が含まれる。選択マーカーは増幅可能な選択マーカーであることができる。好ましい増幅可能な選択マーカーはジヒドロフォレート・レダクターゼ(DHFR)配列である。選択マーカーはThilly (*Mammalian Cell Technology*, Butterworth Publishers, Stoneham, MA; 引用により本明細書に組み入れる)により総説されている。選択マーカーの選択は当業者のレベルの範囲内である。

選択マーカーは、注目の遺伝子と同時に別のプラスミド上で細胞に導入することができ、あるいはそれらは同じプラスミド上で導入することができる。同じプラスミド上の場合、選択マーカー及び注目の遺伝子は異なるプロモーター又は同じプロモーターの制御のもとに置くことができ、後者の配置はシストロンメッセージを生成する。この型の構成物は当業界において知られている(例えば、Levinson及びSimonsen、米国特許No. 4,713,339)。細胞に導入される混合物に「キャリアーDNA」として知られる追加のDNAを加えることも有利であろう。

細胞がDNAを取り込んだ後、これらを適当な増殖培地中で典型的には1〜2日間増殖させることにより注目の遺伝子の発現を開始させる。本明細書において使用する場合は、「適当な増殖培地」は、細胞の増殖及び修飾されたファクターV II遺伝子の発現のために要求される栄養素及び他の成分を含有する培地を意味する。培地は一般に、炭素源、窒素源、必須アミノ酸、必須糖、ビタミン、塩、ホスホリビド、蛋白質及び成長因子を含有する。γ-カルボキシ化され、修飾されたファクターV IIの生産のため、培地はビタミンKを、好ましくは約0.1μg/ml〜約5μg/mlの濃度で含有するであろう。次に、安定に選択マーカーを発現している細胞の増殖について選択を行うために、薬剤による選択が適用される。増幅可能な選択マーカーによりトランスフェクトされた細胞のため、薬剤濃度を増加させて増加したコピー数のクローニング配列について選択し、これによって発現レベルを上昇させることができる。次に、安定にトランスフェクトされた細胞のクローンを、修飾されたファクターV IIの発現についてスクリーニングする。

本発明において使用するための好ましい哺乳類セルラインには、COS-1(ATCC CRL 1650)、ペビーハムスター腎(BHK)及び293(ATCC CRL 1573; Grahamら、*J. Gen. Virol.* 36:59-72, 1977)セルラインが含まれる。好ましいBHKセルラインはtk⁻ ts13 BHKセルライン(Waechter及びBaserge、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:1106-1110, 1982; 引用により本明細書に組み入れる)(以後、BHK 570細胞と称する)である。このBHK 570セルラインはアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(American Type Culture Collection) 12301 Parklawn Dr., Rockville, MD 20852に、ATCCアクセションNo. CRL 10314として寄託されている。tk⁻ ts13 BHKセルラインはまた、アクセションNo. CRL 1632のもとにATCCから入手することもできる。

さらに、多数の他のセルラインを本発明において使用することができる、これらには Rat Hep I (Rat hepatoma; ATCC CRL 1600)、Rat Hep II (Rat hepatoma; ATCC CRL 1548)、TCMK (ATCC CCL 139)、ヒト肝 (ATCC HB 8065)、NCTC 1469 (ATCC CCL 9.1)、CHO (ATCC CCL 6)、及びDUX細胞 (Urlaub 及びChasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, 1980)が含まれる。

本発明に従って生産された修飾されたファクターV IIは、抗ファクターV II抗体カラム上でのアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる。Wakabayashiら、*J. Biol. Chem.* 261: 11097-11108(1986) 及びThimら、*Biochem.* 27:7785-7793(1988) (引用により本明細書に組み入れる) により記載されたカルシウム依存性モノクローナル抗体の使用が特に好ましい。常用の化学的精製手段、例えば、高速液体クロマトグラフィーにより追加の精製を達成することができる。クエン酸バリウム沈澱法を含めて、他の精製法が当業者において知られており、本明細書に記載する新規な修飾されたファクターV IIの精製のために適用され得る (一般に、Scopes, R., *Protein Purification*, Springer-Verlag, N.Y. 1982 を参照のこと)。少なくとも約90~95%均一性の実質的に純粋な修飾されたファクターV IIが好ましく、98~99%又はこれより高い均一性のものが、医薬用途のために最も好ましい。前記のように一旦部分的に又は均一に精製されれば、次に、修飾されたファクターV IIを医薬に使用することができる。

本発明の1つの態様において、修飾されたファクターV IIはその活性化部位において開裂されて、その2本鎖形に転換される。活性化は、当業界において知られている方法、例えば Osterudら、*Biochemistry* 11:2853-2857(1972); Thomas, 米国特許No. 4,456,581; Hedner及びKisiel, *J. Clin. Invest.* 71:1836-1841(1983); 又はKisiel

及びFujikawa, *Behring Inst. Mitt.* 73:29-42(1983) (これらを引用により本明細書に組み入れる) により記載された方法により行うことができる。次に、得られた修飾された「ファクターV II a」は下記のようにして製剤化されそして投与される。

本発明の修飾されたファクターV II又はV II a 分子は特に血管内凝固を含む種々の状態を治療するためにヒトに投与するために有用である。例えば、深部静脈血栓症及び肺塞栓症は常用の抗凝固剤により治療することができるが、ここに記載する修飾されたファクターV IIは、特定された高危険患者、例えば、手術を受けたもの又は充血性心臓まひの血栓塞栓症合併症の発生を予防するために使用することができる。修飾されたファクターV IIは、ヘパリンより選択性であって、一般に損傷部位に暴露された組織因子とのみ結合するので、そして修飾されたファクターV IIは他の凝固蛋白質を破壊しないので、深部静脈血栓の予防のために予防的に使用される場合、ヘパリンよりも有効であり、そして出血合併症を生じにくい。深部静脈血栓症の予防のための修飾されたファクターV IIの投与量は70 kgの患者に対して約50 μ g ~ 25mg/日の範囲、好ましくは1 ~ 10mg/日の範囲であり、そして投与は手術の少なくとも約6時間前に始まりそして少なくとも患者が歩行可能になるまで続けられるべきである。完成した深部静脈血栓症及び/又は肺塞栓症において、修飾されたファクターV IIの投与量は、患者の体重及び状態の重症度に応じて、負荷投与量 (loading dose) としての約50 μ g ~ 25mgの範囲であり、これに続いて約500 μ g ~ 10mg/日の間の維持投与量である。修飾されたファクターV II注入からの出血合併症の可能性が低いので、修飾されたファクターV IIは、血栓切除術又は塞栓切除術と組合わされた手術中又はその後にヘパリンの投与量を代替するか又は減少させることができる。

本発明の修飾されたファクターV II組成物はまた、心臓発生塞栓 (cardiogenic emboli) の予防及び血栓性発作の治療において実質的な用途を有する。出血性合併症を惹起するその低い可能性及びその選択性のために、修飾されたファクターV IIは発作の犠牲者に与えることができ、そして閉塞性動脈血栓の拡大を予防することができる。修飾されたファクターV IIの投与量は発作の性質及び重症度に応じて各患者ごとに異なり、そして一般に下に示唆する範囲であろう。

ここに提供される修飾されたファクターV IIの医薬組成物は、修飾されたファクターV IIの生体内凝固を阻害する能力のため、急性心筋梗塞における有用な治療剤であろう。修飾されたファクターV IIは組織プラスミノゲンアクチベーター又はストレプトキナーゼと共に、心筋梗塞の急性期に投与することができる。急性心筋梗塞においては、患者は少なくとも約1 ~ 25mgの修飾されたファクターV IIの負荷投与量 (loading dose)、及びそれに続く約500 μ g ~ 約10mg/日の維持投与量を与えられる。

本発明の修飾されたファクターV IIは、散在性血管内凝固 (DIC) の治療のために有用である。DICの患者は、広く拡散した微小循環血栓を有しそしてしばしば、必須の凝固因子の消耗から生ずる深刻な出血問題を有する。その選択性のため、修飾されたファクターV IIは、常用の抗凝固剤のようなDICに関連する出血問題を悪化させず、追加の微小循環フィブリン沈着の形成を防止又は阻害するであろう。

医薬組成物は、予防的及び/又は治療的処置のための非経腸的、又は局所的投与のために意図される。好ましくは、医薬組成物は非経腸的に、すなわち静脈内に、皮下に又は筋肉内に投与される。従って本発明は、許容されるキャリアー、好ましくは水性キャリアー

中に溶解した修飾されたファクターV II分子の溶液を含んで成る非経腸投与のための組成物を提供する。種々の水性キャリアー、例えば水、緩衝水、0.4%食塩水、0.3%グリシン等を使用することができる。修飾されたファクターV IIはまた、損傷の部位への供給又は中集のためにリポゾーム調製物に製剤化することもできる。リポゾーム調製物は一般に、例えば米国特許No. 4,837,028、No. 4,501,728、及びNo. 4,975,282に記載されており、これらの記載を引用により本明細書に組み入れる。この組成物は常用のよく知られた安定化技法により安定化され得る。生ずる水溶液は使用のために包装され、あるいは無菌条件下で濾過されそして凍結乾燥され、凍結乾燥された調製物は投与に先立って無菌水溶液と混合される。この組成物は、生理的条件に近づくために必要な場合には、医薬として許容される補助物質、例えばpH調整及び緩衝剤、浸透圧調整剤等、例えば酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム等を含有することができる。これらの製剤中の修飾されたファクターV IIの濃度は、広範囲に、すなわち0.5%未満から通常約1%以上、15又は20重量%まで異なることができ、そして選択される投与法の特定の態様に従って、主として流体体積、粘度等により選択されるであろう。

すなわち、静脈注入のための典型的な医薬組成物は、250mlの無菌リソゲル液及び10mgの修飾されたファクターV IIを含有するようにすることができる。非経腸的に投与可能な組成物の調製のための実際の方法は当業者に知られており又は自明であり、そして例えば *Remington's Pharmaceutical Science* 16版、Mack Publishing Company, Easton PA(1982) に記載されており、この記載を引用により本明細書に組み入れる。

修飾されたファクターV II分子を含有する組成物は、予防的及び

／又は治療的処置のために投与される。治療的適用において、上記のような病気をすでに有する患者に、該病気及びその合併症を治療させ又は少なくとも停止させるのに十分な量で投与される。これを達成するために適当な量は「治療的有效量」として定義される。このために効果的な量は疾患又は損傷の重症度並びに患者の体重及び一般状態に依存するであろうが、しかし一般に70kgの患者に対して約0.05mg〜約25mgの修飾されたファクターV IIの範囲であり、1日当たり約0.5mg〜約10mgの修飾されたファクターV IIがより一般的に使用される。本発明の物質は一般に重症の病気又は傷害、すなわち命にかかわる又は潜在的に命にかかわる状態において使用されることに留意しなければならない。この様な床例において、外来物質の最少化、及び修飾されたヒトファクターV IIのヒトにおける免疫原性の欠如の観点から、これらの修飾されたファクターV II組成物の実質的過剰量を投与することが可能でありそして治療する医師により好ましいであろう。

予防的適用において、修飾されたファクターV IIを含有する組成物は、患者自身の抗凝固能力を増強するために、病気の状態又は傷害に感受性の又はその危険のある患者に投与される。その様な量は「予防的有效量」として定義される。この使用において、正確な量はやはり患者の健康状態及び体重に依存するが、しかし一般に70kgの患者当たり約0.1mg〜約25mgであり、より一般的には70kgの体重当たり約0.5mg〜約10mgである。

組成物の1回投与又は多数回投与を行うことができ、投与レベル及び投与パターンは治療する医師により選択される。毎日の維持レベルを必要とする歩行可能な患者のため、修飾されたファクターV IIは、例えばポータブルポンプ系を用いて連続注入により投与される。ともかく、医薬製剤は、患者を効果的に処置するのに十分な量

の本発明の修飾されたファクターV IIを提供すべきである。

次の実施例は限定的ではなく例示的に提供される。

実施例 I

Ser₅₄₄→Ala₅₄₅ファクターV IIの発現

Ser₅₄₄→Ala₅₄₅ファクターV II活性部位変異体を生成せしめるため、プラスミドF V II (565+2463) /pDX(米国特許No. 4,784,950; 引用により本明細書に組み入れる; アメリカン・タイプ・カルチャ・コレクションにアセッションNo. 40205として寄託されている) を Xba I 及び Kpn I により消化し、そしてセリン344 のコード領域を含む生じた 0.6kb断片を回収した。図に示すようにこの断片を Xba I、Kpn I 消化したM13mp19 にクローニングした。以下に記載するこの操作及び引き続く段階は一般に標準的のプロトコール (例えば、Maniatisら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1982) に記載されているごとく; 引用により本明細書に組み入れる) に従って行った。

変異原オリゴヌクレオチド2C1856(5' -TGG GCC TCC GGC GTC CCC CTT-3') 及び「ユニバーサル」第二プライマー2C87(5' -TCC CAC TCA CGA CGT-3') を用いてZoller及びSmith(前掲)の方法に従ってM18鎖型上で変異誘発を行った。反応生成物を、キナーゼ処理された2C1856を用いてスクリーニングした。陽性ブラークを拾い、そして鋳型DNAを調製し、そして1077位の Pst I 部位から1213の Kpn I 部位まで配列決定した。配列分析は所望の変異の存在を確認した。変異体クローンを1656と命名した。

次に、1656クローンをを用いて発現ベクターを作製した。変異誘発された配列をM13ベクターから〜0.14kbの Pst I -Kpn I 断片として

単離した。図に示すように、この断片をF V II (565+2463) /pDX からの 1.7kbのHind III-Xba I 断片、F V II (565+2463) /pDX からの 0.5kbの Xba I -Pst I 断片、及びF V II (565+2463) /pDX からの 4.3kbの Kpn I -Hind III断片と連結した。変異体クローン及び野生型クローンを Pst I で消化し、そしてM13中の変異体ファクターV II挿入部を Kpn I 及び Xba I で消化し、消化されたDNA のサザンブロットを調製し、そして該ブロットを放射性標識した2C1856によったプローブすることにより、目的とする変異体配列の存在を確認した。

ベビーハムスター腎セルラインBHK570 (アメリカン・タイプ・カルチャ・コレクションにアセッションNo. 10314として寄託されている) を1656発現ベクターの2つの単離体 (#544 及び#545 と称する) によりトランスフェクトした。コンフルエントな10cmプレートのBHK570細胞を5枚の10cmプレート中に、非選択培地 (10%のウシ胎児血清及び1%のPSN 抗生物質混合物を含有するDulbecco改良Eagle 培地 (DMEM) (GIBCO Life Technologies, Gaithersburg, MD)) に希釈することにより細胞を調製した。24時間後、細胞が20〜30%コンフルエンスに達した後、これらを、表1に示すように、1656変異をコードする発現ベクターの1つの単離体、プラスミドp488 (アデノウイルス5 ori、SV40エンハンサー、アデノウイルス2主要後期プロモーター、アデノウイルス2トリパルタイトリダー、5' 及び3' スプライス部位、DHFR^r cDNA並びにSV40ポリアデニレーションシグナルをpML-1 中に含んで成る (Lusky及びBotchan, Nature 293:79-81(1981))、及び10μgのキャリアーDNA(音波処理したサケ精子DNA)により同時形質転換 (10-transfection) した。DNA を15mlのチューブに加え、そして 0.5mlの2×Hepes(25gのHepes、40gのNaCl、1.8gのKCl、0.75gのNa₂HPO₄・2H₂O、

5gのデキストロースを 2.5ℓの蒸留水に希釈し、そしてpHを6.95〜7.0に調整したもの) を添加し、そして該チューブを混合した。各チューブ中のDNA を 0.5mlの0.25M CaCl₂ の添加により沈澱せしめ、この間に DNA/Hepes 溶液を通してバスツールピペットにより空気を泡立てた。次に、チューブを渦動攪拌し、室温にて15分間インキュベートし、そして再度渦動攪拌した。次に、DNA 混合物を細胞のプレート上にピペットを用いて滴加した。プレートを渦動させ、そして室温にて2分間置いた。次に、培地をプレートから除去し、そして2mlのTris-食塩水で置換した。プレートを2分間室温に置き、次にトリス-食塩水を除去し、そして10mlの非選択培地で置換した。プレートを37℃にて2日間インキュベートした。

表 1

プラスミド名	トランスフェクション (1)			
	544	545	544対照	545対照
クローン544	15μℓ	—	15μℓ	—
クローン545	—	30μℓ	—	30μℓ
p488	1.5μℓ	1.5μℓ	—	—
キャリアーDNA	1.6μℓ	1.6μℓ	1.6μℓ	1.6μℓ

2日間のインキュベーションの後、細胞を選択培地 (10%の透析されたウシ胎児血清、1%のPSN 抗生物質混合物及び150mMメソトレキセートを含有するDMEM) 中に希釈し、そしてマキシプレート中1:100、1:250 及び1:500 の希釈でプレートした。プレートを37℃にて1週間インキュベートした。1週間後、培地を変え、そして選択培地で置換し、そしてプレートをコロニー形成についてチェックした。

8日間の後、コロニー形成のあとで、#544 及び#545 トランス

フュージョンプレート(1:500希釈プレート)から、12個のコロニーをランダムに選択した。各コロニーを6-ウエルプレートの1個のウエルにプレートし、そして選択培地中で増殖させた。7日間の後、プレートはコンフルエントになり、コロニーを10cmプレート中の選択培地に分けた。

上記のコロニー、及び野性型ファクターVⅡの発現のためにトランスフェクトされた対照細胞を、³⁵S-メチオニン-システイン・プロテインラベリングミックス(NEN DuPont Biotechnology Systems, Wilmington, DE)により代謝的に標識した。コロニーを増殖せしめ、そして選択培地中でのバルスラベル実験のために用意した。細胞をリン酸緩衝液(Sigma, セントルイス, MO)によりすすぎ、そして20μCi/ml ³⁵S-Cys-³⁵S-Met中で4時間バルスした。4時間後、上清及び細胞を収得した。細胞を、Lenk及びPenman (Cell 16:289-302 (1979))により記載されているようにして実質的に溶解させ、そして400μlの各細胞溶解物を50μlのStaph A(Sigma, セントルイス, MO)により沈降せしめた。

代謝的に標識した細胞からのサンプルを、まず該サンプルを8μlの抗-ファクターVⅡポリクローナル抗体と共に4時間インキュベートすることにより放射免疫沈降(RIP)した。60μlの洗浄したスタフィロコッカス・プロテインAを各サンプルに添加し、そしてサンプルを4℃にて1.5時間揺り動かした。サンプルを遠心し、そして上清を除去した。ペレットを0.7M RIPA緩衝液(10mM Tris (pH7.4)、1%デオキシコール酸(Calbiochem Corp., La Jolla, CA)、1% Triton X-100、0.1% SDS、5mM EDTA、0.7M NaCl)中で2回、そして0.15M RIPA緩衝液(10mM Tris (pH7.4)、1%デオキシコール酸(Calbiochem Corp., La Jolla, CA)、1% Triton X-100、0.1% SDS、5mM EDTA、0.15M NaCl)中で1回洗浄した。

は、対照(トランスフェクトされていない)BHK細胞-コンディション培地(ビタミンK+/-)、野性型ファクターVⅡ、及び修飾されたファクターVⅡを発現する細胞の2つの単離体について、測定の結果を凝固時間として表わす。ファクターVⅡ活性は、対照サンプルを超えての凝固時間の短縮として見られる。

表 2

サンプル	希 釈	凝固時間(秒)
対照+K	1:5	33.1
	1:10	33.4
対照-K	1:5	34.3
	1:10	33.2
野性型ファクターVⅡ	1:20	19.0
	1:40	21.5
	1:80	23.3
修飾されたファクターVⅡ(#6)	1:1	33.5
修飾されたファクターVⅡ(#10)	1:1	32.5

血漿ファクターⅤaに対する修飾されたファクターVⅡの効果を決定するため、修飾されたファクターVⅡ及び組換え野性型又は生来型ファクターVⅡの調製物をファクターX又はファクターIXのいずれかと共にインキュベートし、そしてその活性化を凝固測定又はポリアクリルアミドゲル電気泳動によりモニターした。

実施例Ⅲ

組織因子に結合する修飾されたファクターVⅡの能力

組織因子に関して野性型ファクターVⅡと競争し、そしてその凝固活性を阻害する修飾されたファクターVⅡの能力を、限定された量の組織因子(トロンボプラスチン)の存在下での一段階凝固測定

100μlの1×SDS色素(50mM Tris-HCl (pH8.8)、100mM ジチオスレイトール、2% SDS、0.1%ブロムフェノールブルー、10%グリセロール)を各サンプルに加え、そしてサンプルを5分間煮沸し、次に遠心分離によりプロテインAを除去した。50μlの各サンプルを10%ポリアクリルアミドゲル上で泳動させた。結果が示すところによれば、10コロニー中9コロニーが修飾されたファクターVⅡを分泌した。

実施例Ⅱ

修飾されたファクターVⅡの抗-凝固活性

修飾されたファクターVⅡ蛋白質の凝固を阻害する能力を、対照として野性型ファクターVⅡを用いる1段階凝固測定により測定した。組換え蛋白質を、5μg/mlのビタミンKを含有する培地中で培養した細胞から本質的に上記のようにして調製した。種々の量の修飾されたファクターVⅡ(コロニー544から)又は組換え野性型ファクターVⅡを50mM Tris (pH7.5)、0.1% BSA中で100μlに希釈した。この混合物を100μlのファクターVⅡ欠損血漿(George King Bio-Medical Inc., Overland Park, KS)及び200μlのトロンボラスチンC (Dade, Miami, FL; ラビット脳トロンボラスチン及び11.8mM Ca⁺⁺を含有する)と共にインキュベートした。

凝固測定を自動凝固時間測定器(MLA Eiectra 800, Medical Laboratory Automation Inc., Pleasantville, NY)において行い、そして正常なブールされたヒト血漿(1ユニット/mlのファクターVⅡ活性を含むと予想される; 健康な提供者からのクエン酸処理した血清をブールすることにより調製したもの)の1:5~1:640希釈物を用いて作成された標準曲線を用いて、凝固時間をファクターVⅡ活性のユニットに変換した。この測定を用いて、修飾されたファクターVⅡの調製物は検出し得る凝固活性を示さなかった。表2

法により測定した。

実施例Ⅱに記載したのと同様な一段階測定法により凝固時間を決定した。限定された量の組織因子、一定量の野性型ファクターVⅡ、及び増加する量の変形体ファクターVⅡを混合実験において使用した。ファクターVⅡ/VⅡaプロコアギラント活性の阻害は、増加する量の変形体ファクターVⅡを含む測定における凝固時間の延長として見られよう。

試験サンプル中のファクターVⅡ活性の量を、正常なブールされた血漿中でファクターVⅡ活性を測定した標準曲線に対する%として計算した。ファクターVⅡ活性についての標準曲線は、リン酸緩衝液(PBS)中での正常なブールされた血漿の1:5~1:640にわたる一連の希釈を用いて作成した。この目的のため、正常血漿は約500ng/mlのファクターVⅡを含有すると仮定し、これを1ユニットの活性と考えた。100μlのファクターVⅡ欠損血漿、100μlの血漿希釈物、及び200μlのトロンボラスチンC (Dade, Miami, FL)の混合物を用いてMLA Eiectra 800自動時間測定器での凝固時間を測定した。標準曲線を樹立するため、活性(1:5=100%活性)の%対凝固時間(秒)として結果をグラフ化した。

この測定は、野性型及び修飾されたファクターVⅡを含有する培地が1%未満の血清を含むことを要求した。凝固時間が標準曲線の範囲に入るように希釈をPBS中で行った。1:2の最小希釈が典型的であった。最終体積は100μlであった。コロニー「#10」及び「#6」と称する2つの異なるヒトファクターVⅡSer₄₄-Ala変形体を、この実験において試験した。下記の変に記載する結果は、ファクターVⅡ変形体の量が増加するに従ってファクターVⅡa活性の%が低下することを示した。

表 3

Ser₂₄₄→Ala変形体についての混合測定の結果 (10 μ l / 反応における 100%の活性としてB4A1 (野性型)の増地を使用)

Ser ₂₄₄ →Ala クローンNo	変形体の 増地量	B4A1の 増地量	BHK 対照 (*)	ファクターV II a 活性 (%)
# 10	10 μ l	10 μ l	0	70
# 10	20 μ l	10 μ l	0	51
# 10	30 μ l	10 μ l	0	43
# 10	40 μ l	10 μ l	0	34
# 10	50 μ l	10 μ l	0	28
# 10(-K) (B)	20 μ l	10 μ l	0	78
# 6	10 μ l	10 μ l	0	74
# 6	20 μ l	10 μ l	0	56
# 6	30 μ l	10 μ l	0	46
# 6	40 μ l	10 μ l	0	41
# 6	50 μ l	10 μ l	0	32
# 6 (-K)	20 μ l	10 μ l	0	85
BHK 対照	0	10 μ l	20 μ l	91
BHK 対照(-K)	0	10 μ l	20 μ l	107

(*) トランスフェクトされていないコンディション増地

(B) この記号 (B) が付してあるもの以外は、ファクターV II変形体の発現のため、細胞をビタミンKの存在下で増殖させた。

これらの実験が示すところによれば、Ser₂₄₄→Ala置換を有する変形体は、量依存的にファクターV IIと競争し、そして天然ファクターV II / V II aのプロコアグュラント活性を阻害した。従って、Ser₂₄₄→Ala変形体ヒトファクターV IIは生来のヒトファクター

ろによれば、これらの反応条件下で約60分の後にファクターV II aは十分に不活性化される。

実施例 V

ファクターV IIとDEGRCKとの反応

実施例IVに記載したようにして組換えファクターV II aを調製した。ファクターV II a (1 μ M) を 0.7nM DEGRCK (Glu-Gly-Arg クロロメチルケトン; Calbiochem) と共に37°Cにて1時間、全体積 200 μ l の 0.05M Tris-HCl、0.1M NaCl、0.5% BSA、pH7.5 中でインキュベートした。インキュベーションの後、この混合物を一夜、4°Cにて2 μ l の 0.05M Tris-HCl、0.1M NaCl、pH 7.5 に対して透析した。

遺伝的ファクターV II欠損血漿の凝固時間の変化をモニターすることにより、修飾されたファクターV IIの凝固活性を測定した。100 μ l のサンプルを 100 μ l ずつのファクターV II欠損血漿、ヒト脳トロンボプラスチン (Nawrothら、Thromb. Res. 44:625-637, 1986 に記載されているようにして調製したもの) 及び25mM CaCl₂ と混合した。正常なブールされたヒト血漿の 1:5 ~ 1:200 希釈物を用いて作成した標準曲線から、凝固時間をファクターV II活性のユニットに変換した。ファクターV II aとDEGRCKとのインキュベーションが、ファクターV II凝固活性の完全な喪失をもたらすことが見出された。

以上の記載から、組織因子に結合することができるがしかしファクターX及びIXを活性化することが実質的にできない、修飾された触媒部位を有するファクターV II又はV II aの組成物が提供されることが明らかである。修飾されたファクターV IIは、凝固因子を分解又は消費することなく凝固カスケードを特異的に中断するため作用するので、修飾されたファクターV II調製の投与に伴う不所

V II aと競争し、そしてその結果、ヒト血漿中でのファクターX及び/又はIXの活性化を阻害すると結論することができる。

実施例 IV

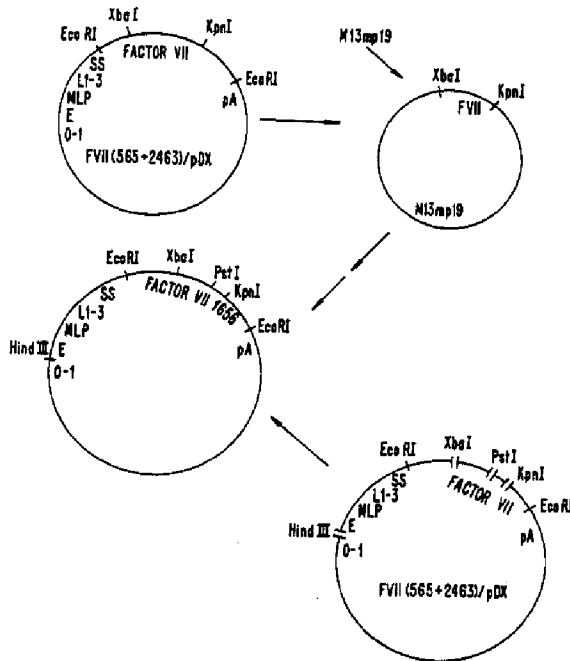
ファクターV IIとPPACKとの反応

組換えファクターV IIを、トランスフェクトされたベビーハムスター腎細胞において製造した。Thiaら (Biochemistry 27:7765-7769, 1988)、Brinkousら (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1382-1386, 1989)、並びにBloern及びThim (Res. Disc. No 269, 564, 1988) (これらを、引用により本明細書に組み入れる) により開示されているようにして、蛋白質を精製しそして活性化した。細胞培養増地を回収し、濾過しそして希釈して濃度を低下させた。次に、希釈した増地を、CaCl₂ を含有する溶離緩衝液を用いる陰イオン交換クロマトグラフィーにより分画した。ファクターV II画分を回収し、そしてカルシウム依存性抗-ファクターV IIモノクローナル抗体を用いる免疫クロマトグラフィーによりさらに精製した。2つの陰イオン交換クロマトグラフィー段階を用いて更なる精製を行い、この場合はファクターV IIをそれぞれ CaCl₂ 及び NaCl を用いて溶出した。ファクターV II aが最終溶出液中に回収された。

50mM Tris-HCl、100mM NaCl、5mM CaCl₂ (pH7.4) 中組換えファクターV II a (1 μ M) を20 μ M PPACK (D-フェニルアラニン-プロリル-アルギニルクロロメチルケトン; Calbiochem, La Jolla, CA) と共に、5、20及び30分間インキュベートした。次に、色原体基質S2288 (H-D-イソロイシン-レ-プロリル-レ-アルギニン-p-ニトロアニリド; Kabi Vitrum AB, Molndal, スウェーデン) を含有する緩衝液を添加して2.5倍の希釈及び0.3mM S2288の最終濃度を得た。p-ニトロアニリンの生成を測定し、そして対照として未処理のファクターV II aを用いる結果と比較した。結果が示すところ

望の副作用は、現在の療法について経験されるのよりも少いと予想することができる。さらに、ここに記載する修飾されたファクターV IIは組換え手段により容易に製造することができる。従って、低投与量の効率、利便性及び経済性、及び低頻度の投与、並びに毒性が相対的に無いことは、特に本発明により提供される利点である。

以上、本発明を、明確な理解のために説明及び実施例により幾分詳細に記載したが、添付される請求の範囲内で幾らかの変化及び変更を行うことができることは明らかであろう。



FIGURE

國際調查報告

International App No. PCT/US 92/01636

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Inventor's Classification: C 12 N 15/57 A 61 K 37/847 C 12 N 9/64		
Int. Cl. 5 C 12 N 5/10 A 61 K 37/847 C 12 N 9/64		
II. FIELDS SEARCHED		
Mikawa's Database Search		
Classification System	Classification Symbols	
Int. Cl. 5	C 12 N A 61 K	
Documentation is furnished under the Mikawa's Database Search to the extent that such documents are included in the fields searched.		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Character or Document, if very pertinent, when appropriate, of the interest message	Reference to Class No.
A	The Journal of Biological Chemistry, vol. 264, no. 13, 5 May 1989, The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc., (US), E. S. WILLIAMS et al.: "Zymogen/enzyme discrimination using peptide chloromethyl ketones", pages 7536-7545, see the whole article (cited in the application)	2-4,7-9
A	Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, vol. 84, no. 15, August 1987, (Washington, DC, US), P. J. O'HARA et al.: "Nucleotide sequence of the gene coding for human factor VII, a vitamin K-dependent protein participating in blood coagulation", pages 8158-8162, see the whole article	27-28
P.A	WO-A 9111514 (ZYMOTENETICS, INC.) 8 August 1991, see the whole document	1
<p>* Special categories of cited documents: (A) documents relating to the subject matter of the invention as claimed in the claims; (B) documents relating to the prior art; (C) documents relating to the state of the art; (D) documents relating to the state of the art; (E) documents relating to the state of the art; (F) documents relating to the state of the art; (G) documents relating to the state of the art; (H) documents relating to the state of the art; (I) documents relating to the state of the art; (J) documents relating to the state of the art; (K) documents relating to the state of the art; (L) documents relating to the state of the art; (M) documents relating to the state of the art; (N) documents relating to the state of the art; (O) documents relating to the state of the art; (P) documents relating to the state of the art; (Q) documents relating to the state of the art; (R) documents relating to the state of the art; (S) documents relating to the state of the art; (T) documents relating to the state of the art; (U) documents relating to the state of the art; (V) documents relating to the state of the art; (W) documents relating to the state of the art; (X) documents relating to the state of the art; (Y) documents relating to the state of the art; (Z) documents relating to the state of the art.</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date of Official Completion of the International Search		Date of Filing of the International Search Report
03-06-1992		26 JUN 1992
International Searching Authority		Signature of Authorized Officer
EUROPEAN PATENT OFFICE		

Form PCT/ISA/210 (Supplementary Sheet) (10/92)

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET	
<p>V. <input checked="" type="checkbox"/> OBSERVATION WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE</p> <p>This international search report has not been prepared in respect of certain claims under Article 17(2)(b) for the following reasons:</p> <p>1. <input checked="" type="checkbox"/> Claim numbers: 1-5. Reason: they relate to subject matter not required to be examined by this Authority. Remark: Although claims 1-5 are directed to a method of treatment of the human body the search has been carried out and based on the alleged effects of compound.</p> <p>2. <input type="checkbox"/> Claim numbers: 6-10. Reason: they relate to parts of the international application that do not comply with the international requirements for such an application as required by Article 17(2)(b).</p> <p>3. <input type="checkbox"/> Claim numbers: 11-15. Reason: they are a dependent claim and are not subject to examination with the international search report.</p> <p>VI. <input type="checkbox"/> OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING</p> <p>This international Searching Authority found multiple inventions in this international application as follows:</p> <p>1. <input type="checkbox"/> As all relevant additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all inventions claimed in the international application.</p> <p>2. <input type="checkbox"/> As only some of the relevant additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those inventions of the international application for which they were paid, specifically: none.</p> <p>3. <input type="checkbox"/> The relevant additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention or inventions claimed in the claims, it is covering by claim 1.</p> <p>4. <input type="checkbox"/> As all search fees or sums could be submitted without effect (including an additional fee, the international Searching Authority did not Remark on Protest.</p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by applicant's protest.</p> <p><input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.</p>	

Form PCT/ISA/210 (Supplementary Sheet) (10/92)

國際調查報告

US 9201636
SA 58214

This annex lists the patent family members relating to the patent document cited in the above-mentioned international search report. The members are not examined in the European Patent Office (EPO) but are included in the European Patent Office (EPO) file as they have been published in the patent family.

Patent document (file in search report)	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A- 9111514	06-08-91	AU-A- 7300291	21-08-91

For more details about this annex, see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/92.

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I
C 1 2 N 15/57	Z N A		
/(C 1 2 N 9/64			
C 1 2 R 1:91)			

(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, MC, NL, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, SN, TD, TG), AT, AU, BB, BG, BR, CA, CH, CS, DE, DK, ES, FI, GB, HU, JP, KP, KR, LK, LU, MG, MN, MW, NL, NO, PL, RO, RU, SD, SE, US

(72) 発明者 パークナー, キャスリーン エル.
アメリカ合衆国, ワシントン 98199, シ
アトル, トゥエンティセカンド アベニュー
ウェスト 3032

(72) 発明者 ベテルセン, ラース クリスティアン
デンマーク国, デーコー-2970 ホエルス
ホルム, ハベバイ 4

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載
 【部門区分】第1部門第1区分
 【発行日】平成11年(1999)9月14日

【公表番号】特表平6-504678
 【公表日】平成6年(1994)6月2日
 【年通号数】
 【出願番号】特願平4-507422
 【国際特許分類第6版】

C12N 9/64
 A61K 31/00 607
 38/43
 C07K 14/745
 C12N 5/10

【F I】

C12N 9/64 Z
 A61K 31/00 607 A
 C07K 14/745
 C12N 5/00 B
 A61K 37/465

手 続 補 正 書

平成11年2月19日

特許庁長官 伊藤山 健 志 殿

1. 事件の表示
 平成11年特許願第507422号
2. 補正をする者

名称 ダイモジェネティクス、インコーポレイテッド(外1名)

3. 代理人
 住所 〒105-8423 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門ビル
 青和特許法律事務所 電話 03-5476-1600
 氏名 分野士(7751) 石 田 敬

4. 補正対象書類名
 請求の範囲
5. 補正対象項目名
 請求の範囲
6. 補正の内容
 請求の範囲を別紙の通りに補正します。
7. 添付書類の目録
 請求の範囲 1通

送 付 済



請求の範囲

1. 血漿因子X又はIXを活性化する修飾されたファクターVIIの能力を実質的に阻害する修飾を少なくとも1個活性中心内に有するファクターVIIを、医薬品として許容されるキャリアーと共に含んで成る医薬組成物。
2. 前記修飾が、ファクターVIIとセリンプロテアーゼ阻害剤との反応を含んで成る、請求項1に記載の医薬組成物。
3. 前記阻害剤が有機リン化合物、スルファニルフルオリド、ペプチドハモメチルケトン又はアザペプチドである、請求項2に記載の医薬組成物。
4. 前記阻害剤が、D-Thr-Pro-Arg クロメチルケトン又はD-グルチル-L-Val-Arg クロメチルケトンから選択されたペプチドハモメチルケトンである、請求項2又は3に記載の医薬組成物。
5. 前記ファクターVIIの修飾が、Ser、Asp及びHisの触媒トライアド中の少なくとも1個のアミノ酸の置換、挿入又は除去を含んで成る、請求項1に記載の医薬組成物。
6. ファクターVIIが残基Ser195の置換によって修飾されている、請求項5に記載の医薬組成物。
7. 前記修飾されたファクターVIIがヒト由来である、請求項1〜6のいずれか1項に記載の医薬組成物。
8. 血漿因子X又はIXを活性化するファクターVIIaの能力を実質的に阻害する、Ser、Asp及びHisの触媒トライアド中の少なくとも1つのアミノ酸修飾を含んで成る、ファクターVII。
9. 前記触媒トライアドがSer195、Asp192及びHis193から構成される、請求項8に記載の修飾されたファクターVII。
10. 前記アミノ酸修飾が置換である、請求項9に記載の修飾されたファクターVII。
11. 前記置換がSer195においてである、請求項10に記載の修飾されたファクターVII。
12. Ser244がAla、Gly、Met又はThrにより置換されている請求項11に記載の修飾されたファクターVII。

13. Ser₁₄₁がAlaにより置換されている、請求項12に記載の修飾されたファクターVII。

14. Asp₁₄₂がGluにより置換されている、請求項10に記載の修飾されたファクターVII。

15. His₁₄₄がLeu又はArgにより置換されている、請求項10に記載の修飾されたファクターVII。

16. ヒト由来である、請求項8に記載の修飾されたファクターVII。

17. ウシ由来である、請求項8に記載の修飾されたファクターVII。

18. 実質的に純粋である、請求項8〜17のいずれか1項に記載の修飾されたファクターVII。

19. その活性化部位において開裂される、請求項8に記載の修飾されたファクターVII。

20. 組織因子に結合する、請求項8〜19のいずれか1項に記載の修飾されたファクターVII。

21. 組織因子への結合について男性型ファクターXIIIと競争する、請求項8〜19のいずれか1項に記載の修飾されたファクターVII。

22. 2つの作用部位に連結された配列コード領域を含んで成るポリヌクレオチド分子であって、それぞれ、プレプロペプチドとビタミンK₂依存性凝固因子の Gla ドメイン、並びにSer、Asp 及びHis

の組織トリアド中に少なくとも一つのアミノ酸修飾を有するGla ドメインが含有ファクターVIIをコードしており、ここで前記のものは前記ポリヌクレオチドは、血漿ファクターX又はIXを活性化する能力が実質的に低下している修飾されたファクターVII分子をコードする、ことを特徴とするポリヌクレオチド分子。

23. 前記アミノ酸修飾を有する組織トリアドがSer₁₄₁、Asp₁₄₂及びHis₁₄₄から構成されている、請求項22に記載のポリヌクレオチド分子。

24. 請求項22又は23のポリヌクレオチド分子によりトランスフェクトされた哺乳類セルライン。

25. 前記組織トリアドがヒトファクターVIIのSer₁₄₁、Asp₁₄₂及びHis₁₄₄である、請求項22に記載のセルライン。